Aus der Medizinischen Universitätsklinik Bern
Direktor: Prof. Dr. W. Frey

Experimentelle Untersuchungen über das Verhalten der Eiweisskörper am Kaninchenherzmuskel nach Verabreichung von Vitamin D und Cholesterin

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Würde eines Doctor medicinae
der
Universität Bern

vorgelegt von

OTTO KNECHT

aus Schwaderloch (Kt. Aargau)

Bern 1941

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Bern
Direktor: Prof. Dr. W. Frey

Experimentelle Untersuchungen über das Verhalten der Eiweisskörper am Kaninchenherzmuskel nach Verabreichung von Vitamin D und Cholesterin

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doctor medicinae

der

Universität Bern

vorgelegt von

OTTO KNECHT

aus Schwaderloch (Kt. Aargau)

Bern 1941

Auf Antrag des Herrn Prof. Dr. Walter Frey von der medizinischen Fakultät zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 16. Juli 1941.

Der Dekan der med. Fakultät:
Prof. Dr. H. Bluntschli.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Einleitung.

Im Zusammenhang mit dem Arteriosklerose problem wurden an der medizinischen Klinik Bern mehrfach Versuche durchgeführt über das Verhalten der Eiweisskörper der Kaninchenaorta nach Verabreichung verschiedener skleroseerzeugender Stoffe, wie Cholesterin, Vitamin D und Adrenalin, oder aber nach operativen Eingriffen wie Kastration und Carotissinusdenervierung. Die löslichen Aorteneiweisskörper wurden in ähnlicher Weise extrahiert, wie ich das weiter unten für den Herzmuskel angegeben habe. Die so gelösten Eiweisse wurden gefällt mit Ammoniumsulfatlösungen in steigender Konzentration von 5—70 %. Es hat sich nun gezeigt, dass die Aorteneiweisskörper derjenigen Tiere, die mit einem der oben erwähnten Stoffe behandelt wurden, bei gleicher Konzentration der Ammoniumsulfatlösung vermehrt ausfallen, als dies bei normalen Tieren der Fall ist. Diese Zunahme der Fällbarkeit tritt schon sehr frühzeitig nach der Behandlung auf, bevor es zu mikroskopisch fassbaren Veränderungen der Gefässe kommt. Bei Anwendung von Vitamin D tritt zwar der Verkalkungsprozess so frühzeitig auf, dass sich der Zeitpunkt der Veränderungen nicht bestimmen lässt. Bei der Einwirkung von Cholesterin oder andern Sklerose erzeugenden Faktoren ist jedoch ein deutliches Intervall zwischen dem Auftreten der Eiweissverschiebungen und demjenigen der Verfettung und Verkalkung vorhanden. Es ist also nicht die Anwesenheit von Lipoiden oder Kalk, die zur Veränderung der Eiweisstruktur führen würde. Es ist vielmehr der kolloidale Umbau des Gewebes das Primäre, der die Vorbedingung für die Anreicherung von Kalk und Lipoiden bedeutet. Es erhebt sich nun die Frage, auf welchem Wege die Veränderungen in den Eiweisssubstanzen zustande kommen. Während der Entwicklung des Organismus kommt es allmählich zu einer immer stärkeren Ver-

festigung der Kolloide unter Abnahme der Hydratation. Gleichzeitig nimmt das Bindegewebe zu. Dafür ist vermutlich die Abnahme der Gewebsaktivität, die veränderte Wirkung von Hormonen, Vitaminen und Fermenten massgebend. Ferner ist von Wichtigkeit die abnehmende Durchblutung der Gewebe. Eine mangelnde Blutzufuhr bedeutet im allgemeinen eine Verfestigung, eventuell Verkalkung. Wichtig für den Grad dieser Veränderungen ist ferner auch die funktionelle Abnutzung, die mechanische Beanspruchung, die Abnahme der Oxydationstendenz der Gewebe und die Hemmung der intramuralen Durchströmung durch Hypertension (Vannotti). Die gröber dispersen Körper, besonders hyaline und mukoide Substanzen, neigen stark zur Adsorption von fremden Substanzen. Speziell das Aortengewebe als Gewebe mit ausgesprochen langsamem Stoffwechsel, von Bürger bradytrophes Gewebe genannt, hat die Neigung solche Schlackenstoffe aufzunehmen. In all diesen Fragen ist man noch ziemlich auf Hypothesen angewiesen. Es könnte ein Zusammenhang mit der Schilddrüse bestehen. Nach Wegelin treten beim Basedow arteriosklerotische Veränderungen nur spärlich auf, wogegen sie beim Myxoedem oft stark und frühzeitig vorhanden sind. Nach Anitschkow verhindert die Thyroxinfütterung die Arteriosklerose und senkt das Blutcholesterin. Nach Markoff macht sich der Antagonismus zwischen Thyroxin und Cholesterin auch in der Menge der Gewebsoxydasen geltend. Das Thyroxin erzeugt eine starke Zunahme derselben, während das Cholesterin eine Abnahme der oxydativen Fähigkeiten des Gewebes zur Folge hat.

Fragestellung.

Anschliessend an die von Schönholzer ausgeführten Versuche über das Verhalten der Eiweisskörper in der Aorta, beauftragte mich Prof. Frey, das Verhalten der Eiweisskörper am Kaninchenherzmuskel unter skleroseerzeugenden Faktoren zu untersuchen und zwar:

1. ob eine Veränderung der Eiweisskomponenten im Herzmuskel überhaupt auftritt, und

2. wenn eine solche vorhanden ist, ob sie sich mit derjenigen der Aorta in Beziehung bringen lässt.

Von den verschiedenen skleroseerzeugenden Faktoren wurden 2, nämlich Vitamin D und Cholesterin zu diesen Versuchen herangezogen.

Bevor ich auf die Methodik und die Resultate meiner Untersuchungen eingehe, ist es notwendig, einige Angaben aus der Literatur über die Bestimmung und das Verhalten der Muskeleiweisskörper zu machen.

Literaturangaben über die Bestimmung und das Verhalten der Muskeleiweisskörper.

Diesen Angaben möchte ich vorausschicken, dass in der Literatur die Arteriosklerose der Aorta sowie der übrigen Gefässe ausgiebig bearbeitet wurde. Ich möchte darauf nicht näher eintreten. Unklar ist bisher, wie Schönholzer ausführt, die Frage, um was für Veränderungen es sich primär im Gefäss handelt, das heisst, was für Veränderungen mit der Eiweissgrundsubstanz vor sich gehen, damit sie in die Lage kommt, fremde Stoffe in grosser Menge adsorbieren zu können.

Ueber das quantitative wie qualitative Verhalten der Muskeleiweisskörper sind in den letzten Jahren mehrere Arbeiten erschienen. Die wichtigsten darunter sind diejenigen von Howe, Edsall, von v. Muralt und Edsall, Weber, Meyer und Fürth. v. Muralt und Edsall haben die von ihnen getrennten Fraktionen physikalisch charakterisiert. Dadurch war es möglich die verschiedenen Fraktionen, deren chemische Struktur bis heute noch unbekannt ist und die früher unter den verschiedensten Namen in der Literatur bekannt waren, einheitlich zu benennen. Man unterscheidet heute ein Muskelalbumin = Myogen und zwei Muskelglobuline = Myosin und Globulin X.

Das Myosin ist ein leicht fällbares Eiweiss, das vollständig ausfällt bei einer Salzkonzentration von 0,03—0,04 mol. KCl und einem p_H von 7—5,4. Es zeigt Strömungsdoppelbrechung und hat eine hohe Viskosität. Beim Einspritzen in destilliertes Wasser bildet es eigentümliche Spinnfäden.

Das Globulin X ist die zweite Globulinfraktion des Muskeleiweisses. Es besitzt keine Doppelbrechung und seine Viskosität ist niedriger als diejenige des Myosins. Das Globulin X lässt sich fällen bei p_H 7 mit einer Konzentration von 0,005 mol KCl. Vollständig fällt das Globulin X aus bei einem p_H von 5,5—5,1 und

bei einer Konzentration von 0,016 mol KCl-Acetat. Beim Einspritzen in destilliertes Wasser bildet es keine Fäden.

Das Myogen ist nicht fällbar wie die beiden Globuline. Sogar bei vollständiger Abwesenheit von Salzen bleibt es in Lösung. Es besitzt keine Strömungsdoppelbrechung und hat eine sehr niedrige Viskosität. Bei längerem Stehenlassen dieser Lösung trübt sich dieselbe, das Myogen wird in Myogenfibrin verwandelt.

Die ersten bedeutenden Untersuchungen über Eiweissfraktionierung wurden von Howe durchgeführt. Bei verschiedenen Molarkonzentrationen einer Phosphatpufferlösung hat dieser Autor die einzelnen Fraktionen bestimmt. Es folgten dann die Arbeiten von v. Muralt und Edsall, die ich bereits erwähnt habe. Meyer hat die Löslichkeit der Muskeleiweisskörper unter verschiedenen Extraktionsbedingungen studiert. Nach diesem Autor nimmt die Eiweisslöslichkeit von p_H 7 bis 9,5 mit steigender Alkalität zu. Er hat auch die Mengenbestimmung der einzelnen Fraktionen am roten und weissen Kaninchenmuskel durchgeführt. Dabei ging er in folgender Weise vor: Der blutfreie Muskelbrei wurde 8—10 mal extrahiert. Bei jeder Extraktion wurde der Brei mit der Extraktionslösung während $1^1/_2$ Std. gut umgerührt, nachher zentrifugiert und die mit Eiweisskörpern gesättigte Extraktionslösung abgegossen, das Sediment mit neuer Extraktionslösung vermischt und gerührt. Auf diese Weise wurde eine maximale Ausbeute der löslichen Eiweisskörper erzielt. Während in den ersten fünf Extraktionen alle Eiweissfraktionen enthalten sind, ist das Myogen in den weitern Fraktionen nicht mehr nachweisbar. Das Globulin X, das in den ersten Fraktionen in annähernd gleicher Menge wie das Myogen vorhanden ist, nimmt ebenfalls stark ab. Praktisch bestehen also die letzten drei bis fünf Extraktionen nur noch aus Myosin. Die Mengenverhältnisse hat Meyer wie folgt angegeben:

in % des Gesamt-N

	weisse Musk.	rote Musk.
Rest-N	13	11
Myogen-N	19	15
Globulin X-N	19	15
Myosin-N	34	35
Stroma-N	15	24

Wladimiroff hatte 1920 eine Arbeit publiziert, in der er zwei Arten von Eiweisstoffen unterschied, nämlich das Myosin als Muskelplasmaeiweiss und das Myostromin, ein Nucleoprotein, als Muskelstromaeiweiss. Der Herzmuskel soll an Myostromin am reichsten sein, während zum Beispiel der Musc. ileopsoas daran sehr arm ist. Das Myostromin soll besonders in denjenigen Muskeln vermehrt vorhanden sein, welche sich energisch und rasch kontrahieren und viel Arbeit leisten müssen. Ferner nimmt der Gehalt an Myostromin im Alter zu.

Wassermann fand in seinen Untersuchungen am Herzmuskel des Meerschweinchens eine Zunahme des Stroma-N gegenüber demjenigen der Skelettmuskeln.

An der Berner Klinik haben Vannotti und Hartmann Versuche über das Verhalten der Muskeleiweisskörper nach Anwendung von Histamin durchgeführt. Für diese Versuche haben sie eine Methode der Extraktion und Fraktionierung verwendet, die im Prinzip derjenigen von Meyer sehr ähnlich ist. Die Abweichungen von der letzteren lassen sich folgendermassen kurz wiedergeben: Der Muskelbrei wird nur einmal extrahiert mit der 20-fachen Menge Extraktionslösung während zwei Stunden. Das gewonnene Filtrat wird in die drei folgenden Komponenten getrennt:

1. Myosin
2. Myogen + Globulin X
3. Rest-N.

Die genaue Beschreibung der Methodik habe ich unten angeführt.

Versuchsanordnung.

Bei meinen Versuchen verwendete ich Kaninchen beiderlei Geschlechts im Gewichte von 1500—2800 g. Die Tiere wurden eingeteilt in drei Serien:

A Normaltiere
B Vitamin D Tiere
C Cholesterintiere.

Die Vitamin D Tiere erhielten täglich 3 mg Vitamin D peroral bis maximal 24 mg. Pro Kg Körpergewicht erhielten die Tiere folgende Mengen an Vitamin D:

1. Gruppe 3,7 mg
2. Gruppe 9,0 mg
3. Gruppe 12,7 mg.

Die dritte Serie von Tieren erhielt Cholesterin in Oel gelöst, da Cholesterin in Pulverform verabreicht wohl eine Hypercholesterinaemie erzeugt, jedoch an der Aortenwand keine Veränderungen hervorruft. Die Tiere waren in vier Gruppen zu je fünf eingeteilt. Sie erhielten:

1. Gruppe $5 \times 0{,}5$ g
2. Gruppe $10 \times 0{,}5$ g
3. Gruppe $15 \times 0{,}5$ g
4. Gruppe $20 \times 0{,}5$ g.

Das Cholesterin wurde in der 10-fachen Menge Leinöl gelöst. Davon wurde den Tieren täglich 5 ccm mit fein zerschnittenen roten Rüben gut vermischt und verfüttert. Die Tiere frassen dieses Gemisch ohne Rückstände zu lassen und nur ein einziges Tier zeigte leichte Störungen von Seiten des Magendarmkanals.

Methode zur Bestimmung der Eiweissfraktionen:

Die Tiere wurden mit Luftembolie getötet. Bei den Cholesterintieren wurden sofort nach der Eröffnung der Brust- und Bauchhöhle 10 ccm Blut mit einer 10 ccm Pravazspritze aus der Vena cava inf. entnommen zur Bestimmung des Cholesteringehaltes im Blut. Zur Entblutung des Herzmuskels wurde eine Kanüle in den linken Vorhof eingelegt und das Herz mit gekühlter Ringerlösung (4 Grad Celsius) bei einem hydrostatischen Druck von 1,2 m durchspült. Im rechten Vorhof wurde eine Oeffnung angebracht, durch welche die Spülflüssigkeit abfliessen konnte. Nach $^3/_4$ bis 1 Stunde war das Herz vollständig durchspült. Dieses wurde alsdann aus dem Brustkorb herausgenommen, nochmals mit Ringerlösung von ca. 4 Grad Celsius abgespült und der Klappenapparat sowie geronnenes Blut entfernt. Darauf wurde das Herzgewicht bestimmt und 0,1 g des Herzmuskels (um gut vergleichbare Werte zu erhalten wurde dieses Stück immer der linken Ventrikelwand entnommen) verascht zur Bestimmung des Gesamt-N_2 Gehaltes im Herzmuskel. Der übrige Teil des Herzens wurde in einem eisgekühlten Porzellanmörser fein zerschnitten und anschliessend mit Quarzsand fein zerrieben. Das Zerreiben dauerte etwa 10 Minuten. Es entstand ein homogener Brei ohne sichtbare Muskelpartikel. Die zuzusetzende Menge Sand wurde so gewählt, dass der Brei nicht zu feucht und nicht zu trocken war. Dieses Gemisch wurde dann in einen weithalsigen Rundkolben übergeführt und mit der 20-fachen Gewichtsmenge gekühlter Extraktionslösung von folgender Zusammensetzung:

	n/10 Borat (BO_3H_3)	425,0
p_H = 9,0	n/10 NaOH	75,0
	Kal. chlorat. „Merk“	45,0
	Aq. dest. ad	1000,0

vermischt und im eisgekühlten Wasserbad mit dem elektrischen Rührer während zwei Stunden extrahiert. Nachher wurde das Gemisch durch einfache Filter im Eisschrank filtriert. Als Filter verwendete ich ein extra hartes Faltenfilter (Firma Schleicher und Schüll, Durchmesser 15 cm). Die Filtration dauerte ziemlich lange und wurde in zwei Portionen angesetzt und über Nacht stehen

gelassen. Das Filtrat war völlig klar und von gelber bis goldgelber Farbe. Von diesem Filtrat wurden aliquote Teile zur Untersuchung verwendet. Als erstes wurde der N_2 Gehalt des Filtrates bestimmt. Darauf wurde das Myosin von den andern Filtrateiweissen getrennt, indem zu dem aliquoten Teil neun Teile Aq. dest. zugegeben wurden. In einem Parallelversuch wurde ein Tropfen Methylrot zugegeben und zu dieser Lösung wurden so viele Tropfen n/10 HCl zugegeben bis der Farbton vor dem Umschlag von gelb nach rot war. Dieser Umschlagspunkt entspricht einem p_H von 5,4. Die Molarkonzentration dieses so verdünnten Filtrates war 0,086 mol. KCl. Im Hauptversuch, der frei war von Methylrot, wurde die gefundene Anzahl Tropfen (in der Regel waren es 8 entsprechend dem konstanten p_H = 9,0 der Extraktionslösung) zugefügt und gut umgerührt. Es trat sofort eine Trübung der Flüssigkeit auf. Nach ca. einer Stunde hat sich diese Trübung zu kleinen weissen Flocken zusammengeballt. Nach weitern zwei Stunden waren diese Flocken sedimentiert. In den ersten Versuchen habe ich diese Lösung zentrifugiert, um nachher das Myosin und die darüberstehende Flüssigkeit mit dem Myogen und Globulin X getrennt zu bestimmen. Es zeigte sich aber, dass trotz langem Zentrifugieren sich beim Abgiessen der Flüssigkeit kleine Myosinflocken vom Sediment loslösten und sowohl bei der Myosinbestimmung wie bei der Myogen + Globulin X-Bestimmung Ungenauigkeiten verursachten. Ich habe darauf diese Art der Trennung der beiden Eiweissarten verlassen und bin folgendermassen vorgegangen: Nach dem Ausflocken des Myosins habe ich die Lösung durch harte Filter filtriert und nur das Filtrat bestimmt. Indem ich den N_2-Wert dieses myosinfreien Filtrates von demjenigen des Muskelextraktes subtrahierte, erhielt ich indirekt den Myosinwert. Der Reststickstoff wurde in der üblichen Weise durch Fällung mit 10 % Trichloressigsäure bestimmt. Die einzelnen Portionen wurden in einem Kjeldahl-Kolben mit Phosphorschwefelsäure und etwas Kupfersulfat verascht, nachher im Pregl'schen Apparat destilliert unter Vorlage von 5—15 ccm H_2SO_4 n/100. Die Titration erfolgte mit NaOH n/100 gegen Methylrot. Alle Bestimmungen wurden meistens 3-fach durchgeführt, um sichere Resultate zu erhalten.

Im Folgenden gebe ich die Resultate der einzelnen Versuche wieder.

Resultate der einzelnen Versuche

in mg Eiweiss, bezogen auf 5 g Herzmuskel.

A. Normaltiere.

Tiere	Filtrat	Myogen + Globulin X	Myosin	Rest - N	
1.	36,78	19,87	8,20	9,95	
	37,20	17,49	9,46	—	
	37,44	19,87	9,51	—	
	37,14	19,08	8,72	9,95	Mittelwert
2.	36,60	20,40	8,53	9,28	
	36,58	18,30	10,21	—	
	36,13	18,44	8,90	—	
	36,44	19,11	9,21	9,28	Mittelwert
3.	38,70	19,74	9,93	9,66	
	—	17,92	—	—	
	40,05	16,80	10,44	—	
	39,37	18,15	10,18	9,66	Mittelwert
4.	43,51	22,65	13,05	9,91	
	—	19,01	—	10,04	
	45,31	21,45	13,33	—	
	44,41	21,04	13,19	9,98	Mittelwert
5.	42,89	21,92	13,66	10,50	
	42,89	22,71	14,22	9,91	
	—	22,85	12,54	—	
6.	49,04	25,31	13,29	10,67	
	48,76	24,33	13,75	—	
	48,90	24,82	13,52	10,67	Mittelwert
7.	39,20	19,38	10,45	9,37	
	40,77	20,60	10,42	9,75	
	39,99	19,99	10,44	9,56	Mittelwert

B. Vitamin D - Tiere.

Tiere	Filtrat	Myogen + Globulin X	Myosin	Rest - N	
1.	41,03	20,44	10,66	10,08	
	—	18,48	10,49	—	
	43,22	22,40	—	—	
	42,13	20,44	10,57	10,08	Mittelwert
2.	41,26	19,92	11,33	10,04	
	44,10	20,48	13,01	—	
	43,03	22,30	10,45	—	
	42,80	20,90	11,86	10,04	Mittelwert
3.	42,80	21,17	12,96	10,61	
	43,87	22,57	12,87	—	
	44,89	—	12,45	—	
	43,85	21,87	12,76	10,61	Mittelwert
4.	51,75	—	16,18	11,05	
	55,71	28,43	18,18	—	
	51,65	24,93	16,50	—	
	53,04	26,68	16,89	11,05	Mittelwert
5.	46,76	28,94	11,70	10,54	
	46,85	25,72	14,27	—	
	46,62	18,58	12,93	—	
	46,74	24,41	12,97	10,54	Mittelwert
6.	44,19	19,40	12,91	11,68	
	44,52	17,09	14,50	10,27	
	—	17,03	14,64	—	
	44,35	17,84	14,02	10,97	Mittelwert
7.	38,83	11,93	15,01	8,65	
	43,68	19,19	15,52	8,95	
	43,82	19,08	15,71	8,92	
	42,11	16,73	15,41	8,84	Mittelwert
8.	42,19	19,17	11,11	11,91	
	44,43	17,35	15,17	—	
	43,73	19,38	14,61	9,74	
	44,08	18,37	14,89	10,82	Mittelwert

C. Cholesterintiere.

Tiere	Filtrat	Myogen + Globulin X	Myosin	Rest - N	
1.	36,20	16,25	11,34	8,61	
	36,12	17,46	10,81	7,85	
	—	—	—	9,49	
	36,16	16,85	11,07	8,65	Mittelwert
2.	39,81	21,64	10,06	8,11	
	38,61	20,80	9,70	—	
	40,35	—	—	8,67	
	39,59	21,22	9,88	8,39	Mittelwert
3.	39,82	21,50	8,32	10,00	
	46,65	21,71	14,94	—	
	47,91	21,19	16,20	10,52	
	44,79	21,47	13,15	10,26	Mittelwert
4.	37,44	20,24	8,67	8,53	
	41,72	19,85	12,04	9,83	
	39,58	20,05	10,35	9,18	
5.	39,82	19,75	11,33	8,74	
	40,82	21,71	10,37	—	
	40,32	20,73	10,85	8,74	Mittelwert
6.	38,61	16,20	12,96	9,45	
	52,72	24,27	16,94	10,67	
	52,42	23,49	17,42	11,51	
	47,92	21,54	15,59	10,79	Mittelwert
7.	33,57	12,93	12,79	7,85	
	32,06	12,14	11,90	8,02	
	32,84	12,53	12,29	—	
	32,82	12,53	12,33	7,96	Mittelwert
8.	32,96	12,81	12,63	7,52	
	35,00	13,06	14,34	7,60	
	35,06	13,62	13,84	—	
	34,34	13,16	13,60	7,56	Mittelwert

Tiere	Filtrat	Myogen + Globulin X	Myosin	Rest - N	
9.	34,08	11,87	14,06	8,15	
	32,54	12,85	11,37	8,32	
	33,68	12,96	12,40	—	
	33,43	12,56	12,61	8,23	Mittelwert
10.	37,16	14,49	14,14	8,53	
	37,66	15,71	13,47	8,48	
	37,55	15,38	13,69	—	
	37,44	15,19	13,77	8,50	Mittelwert
11.	42,14	15,81	17,05	9,28	
	42,34	16,90	15,57	9,87	
	—	—	16,19	—	
	42,24	16,42	16,24	9,58	Mittelwert
12.	34,50	12,50	12,72	9,28	
	35,70	13,32	13,64	8,74	
	35,10	12,91	13,28	9,01	Mittelwert
13.	36,60	14,84	13,02	8,74	
	37,63	14,48	12,99	10,16	
	37,11	14,66	13,00	9,45	Mittelwert
14.	37,68	15,54	12,82	9,32	
	40,24	15,52	15,77	8,95	
	38,96	15,53	14,29	9,14	Mittelwert
15.	33,35	14,42	11,62	7,31	
	32,28	12,88	10,83	8,57	
	32,62	—	11,17	8,23	
	32,75	13,55	11,16	8,04	Mittelwert
16.	35,36	14,78	12,98	7,60	
	35,67	13,75	13,72	8,20	
	—	—	—	7,81	
	35,46	14,29	13,35	7,87	Mittelwert
17.	36,65	13,90	14,14	8,61	
	37,66	13,73	14,98	8,95	
	37,58	—	14,90	—	
	37,63	13,81	14,67	8,78	Mittelwert

Tiere	Filtrat	Myogen + Globulin X	Myosin	Rest - N	
18.	28,53	10,65	12,29	5,59	
	29,74	9,44	13,33	6,97	
	31,02	11,76	11,53	7,73	
	31,27	11,94	11,53	—	
	30,14	10,95	12,19	6,76	Mittelwert
19.	32,42	13,38	11,14	7,90	
	32,37	12,15	10,98	9,24	
	—	12,15	—	8,74	
	32,39	12,56	11,06	8,63	Mittelwert
20.	38,02	15,84	14,28	7,90	
	36,76	15,61	13,46	7,69	
	37,74	15,18	14,33	8,23	
	37,51	15,54	14,03	7,94	Mittelwert

Tabelle 1 **Normaltiere.**

Filtrat-N = 100 %

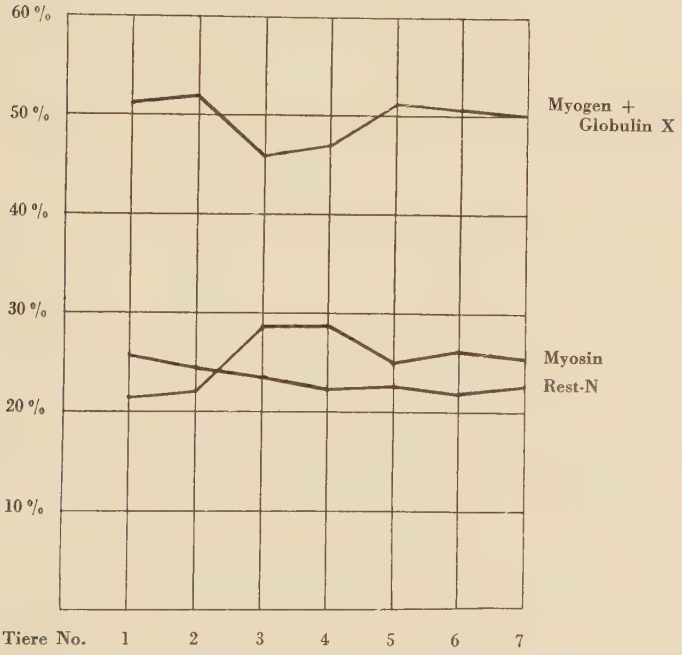


Tabelle 2 **Vitamin D Tiere.**

Erhaltene Vitaminmenge:

a) absolut

6 6 6 15 15 15 21 24 mg

b) pro kg Körpergewicht

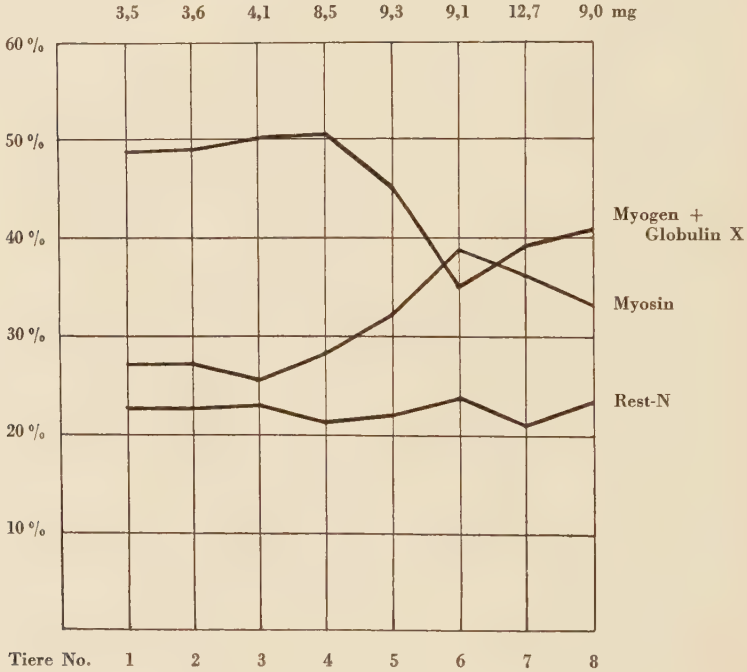


Tabelle 3 **Cholesterin-Tiere.**

Dosierung: Tiere 1.— 5. $5 \times 0{,}5$ g Cholesterin
„ 6.—10. $10 \times 0{,}5$ g „
„ 11.—15. $15 \times 0{,}5$ g „
„ 16.—20. $20 \times 0{,}5$ g „

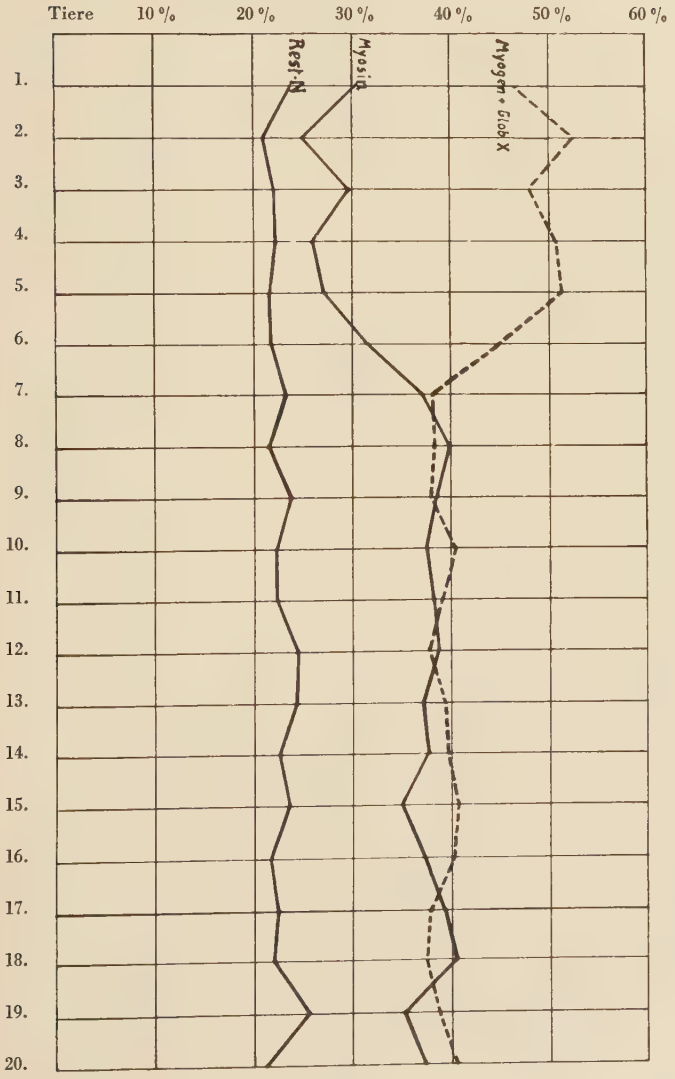


Tabelle 4

Verhalten des Körpergewichtes vor und nach Behandlung, sowie Verhalten des Herzgewichtes zum Körpergewicht.

a) bei den Vitaminen - D Tieren.

	Körpergewicht		Differenz	Vitaminmenge	Herzgewicht	
	vor	nach			in g	in ‰ Körpergewicht
1.	1700	1720	+ 20	6 mg	4,22	2,45
2.	1620	1640	+ 20	6 »	4,57	2,79
3.	1440	1460	+ 20	6 »	3,75	2,57
4.	1840	1770	− 70	15 »	3,55	2,00
5.	1660	1610	− 50	15 »	3,89	2,42
6.	1870	1645	− 225	15 »	4,76	2,89
7.	1800	1650	− 150	21 »	5,50	3,33
8.	2800	2700	− 100	24 »	7,02	2,60

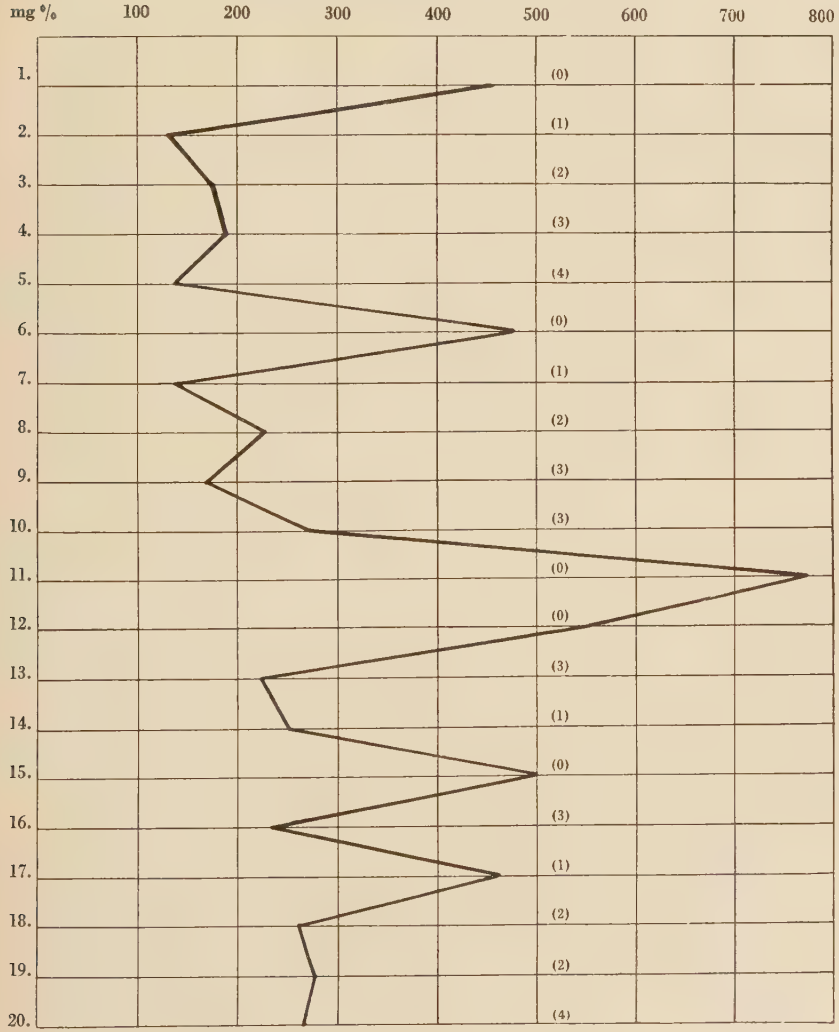
Tabelle 4 b) bei den Cholesterin - Tieren.

	Körpergewicht		Differenz	Vitaminmenge	Herzgewicht	
	vor	nach			in g	in ‰ Körpergewicht
1.	1920	1900	− 20	5×0,5	4,8	2,53
2.	1500	1800	+ 300	»	4,2	2,33
3.	1740	2080	+ 340	»	4,25	2,04
4.	1560	1780	+ 220	»	3,8	2,14
5.	1650	2000	+ 350	»	4,8	2,40
6.	2260	2290	+ 30	10×0,5	5,9	2,58
7.	2280	2250	− 30	»	6,4	2,80
8.	2600	2865	+ 265	»	7,6	2,64
9.	2260	2420	+ 160	»	5,9	2,58
10.	1930	2250	+ 320	»	6,4	2,84
11.	1740	1980	+ 240	15×0,5	4,25	2,15
12.	1840	2100	+ 260	»	5,1	2,43
13.	1440	1810	+ 370	»	4,35	2,40
14.	1830	2180	+ 350	»	4,8	2,10
15.	1500	2050	+ 550	»	5,1	2,50
16.	1800	2100	+ 300	20×0,5	4,9	2,33
17.	1630	2260	+ 630	»	5,9	2,61
18.	1810	2100	+ 290	»	5,55	2,64
19.	1600	2100	+ 500	»	5,25	2,50
20.	2440	2690	+ 250	»	7,85	2,91

Tabelle 5

Cholesterinwerte im Blut bei den Cholesterintieren.

Die in Klammer gesetzten Zahlen geben die Anzahl Tage an von der letzten Cholesterinfütterung bis zum Tode.



Diskussion der Ergebnisse.

Die Tabelle 1 gibt die Zusammenfassung der Werte bei den Normaltieren wieder. Diese Werte dürfen nicht direkt verglichen werden mit denjenigen aus den Arbeiten von Meyer oder Wassermann. Dort handelte es sich darum, die maximalen Mengen der einzelnen Eiweissarten zu erhalten. Dazu waren mehrere Extraktionen am selben Muskelbrei notwendig. Bei meiner Extraktionsmethode konnte nur ein x-ter Teil der höchstmöglichen Ausbeute gewonnen werden. Diese Resultate lassen sich vergleichen mit denjenigen der Aorteneiweisskörper, die unter ähnlichen Extraktionsbedingungen gewonnen wurden. Es wurden deshalb nur die einzelnen Fraktionen des Filtrates in die Tabellen einbezogen, wobei der N_2-Gehalt des Filtrates = 100 % angenommen wurde. Der Muskelgesamt-N und der Stroma-N wurden ausser Acht gelassen. Aus dem Muskelbrei wurden durchschnittlich 35 % N_2 extrahiert. Die restlichen 65 % dürfen aber nicht einfach dem Stroma N- zugeschrieben werden, sondern neben diesem sind noch x Teile von Myosin, Globulin X und Myogen darin vorhanden. Wassermann fand bei seinen Untersuchungen eine Erhöhung des Stroma-N von 17 bzw. 24 auf 28,5 % des Gesamt-N_2, wobei angenommen wird, dass sowohl der komplizierte Bau des Herzmuskels wie auch die stärkere Ausdehnung des Gefäss- bzw. Kapillarsystems die Ursache sei. Ebenfalls fand er eine Zunahme des Myosins von 34 bzw. 35 auf 37,5 %, welches mit der Muskelkontraktion in enger Beziehung stehen soll und daher beim Herzmuskel vermehrt auftritt. Wird der Stroma-N sowie der Filtrat-N vom Gesamtmuskel-N subtrahiert, so verbleiben noch ca. 35 %, welche nicht extrahiert wurden und den Fraktionen Myosin, Myogen + Globulin X angehören. Wenn wir die einzelnen Fraktionen der Tabelle 1 vergleichen, ist ein deutlicher Unterschied zwischen der Menge Myosin und Myogen + Globulin X feststellbar.

Während die letztere Fraktion ca. 50 % des Filtrat-N beträgt, ist das Myosin nur zu ca. 25 % vorhanden. Der Rest-N beträgt 20—25 %.

Die Tabelle 2 stellt die Mengenverhältnisse nach Behandlung mit *Vitamin D* dar. Bei denjenigen Tieren, die eine durchschnittliche Menge von nur 3,7 mg Vitamin pro kg Körpergewicht erhalten haben, zeigen sich noch keine Veränderungen der Eiweisszusammensetzung. Die Gewichtskurve zeigt bei diesen Tieren noch eine leichte Zunahme. Bei einer stärkern Dosierung (8—9 mg) ist sowohl eine Zunahme des Myosins als auch eine Abnahme des Myogens + Globulin X deutlich feststellbar. Das Myosin nimmt in der Weise zu, dass es schliesslich dem Myogen + Globulin X-Gehalt gleichkommt. Im Zusammenhang mit diesen Eiweissveränderungen zeigt die Gewichtskurve eine deutliche Abnahme des Körpergewichtes und die Tiere fallen auf durch Schläfrigkeit, starke Ermüdbarkeit und Atemnot. Bei diesen Tieren zeigte die Aorta schon makroskopische Veränderungen in Form von kleinen weissen „Plaques", die dann stark ausgeprägt waren bei den Tieren 7 und 8. Die hohen Dosen wurden im allgemeinen von den Tieren schlecht vertragen und es gingen mehrere Tiere daran zugrunde, bevor ich Gelegenheit hatte, den Herzmuskel zu analysieren.

Diese Versuchsserie zeigte eine Zunahme des leicht fällbaren Myosins auf Kosten des Myogen + Globulin X, während der Rest-N sich im Vergleich zu den Normaltieren nicht wesentlich verändert hat. Gegen diese Resultate kann eingewendet werden, dass die gewählte Extraktionsmethode nur einen Teil der Gesamtmenge der verschiedenen Fraktionen extrahiert und dass das Myosin unter pathologischen Bedingungen vermehrt in Lösung gehen könnte im Vergleich zu den andern Filtrateiweissen.

Meyer hat in seiner Arbeit gezeigt, dass das Myosin sehr schwer extrahierbar ist bis zur völligen Erschöpfung des Muskelbreies. Das Myogen ist nach fünf Extraktionen schon vollständig in Lösung, während für das Myosin deren zehn notwendig sind.

Es ist nicht wahrscheinlich, dass unter pathologischen Bedingungen das Myosin als einziges Muskeleiweiss vermehrt in Lösung gehen würde. Die Resultate haben vielmehr ergeben, dass die Zunahme des Myosins nicht unabhängig von den andern Eiweiss-

körpern ist, das heisst, dass ungefähr in dem Masse, in welchem das Myosin zunimmt, das Myogen + Globulin X abnimmt. Dieses Verhalten deutet vielmehr auf eine Verschiebung der Eiweissmengenverhältnisse im Herzmuskel als auf eine einseitig vermehrte Löslichkeit des Myosins.

Diese Resultate können in Parallele gebracht werden zu der vermehrten Fällbarkeit der Aorteneiweisskörper durch Ammoniumsulfat. Aus dem Vergleich meiner Resultate mit denjenigen der Aorteneiweisskörper geht hervor, dass die letzteren bei folgenden Dosen schon eine vermehrte Fällbarkeit aufwiesen:

a) bei 5,9 mg Vitamin D pro kg Körpergewicht,
b) bei $5 \times 0{,}5$ g Cholesterin,

während der Herzmuskel erst bei wesentlich höheren Dosen eine Veränderung in der Muskeleiweisszusammensetzung zeigte. Beim Aortengewebe, als Gewebe mit ausgesprochen langsamem Stoffwechsel, von Bürger bradytrophes Gewebe genannt, tritt demnach viel eher eine Veränderung in der Eiweisszusammensetzung auf als im Herzmuskel, daher auch die stärkere Neigung, Schlackenstoffe aufzunehmen.

Es gelang mir nicht, einen Zeitunterschied zwischen dem Auftreten der Eiweissumgruppierungen und demjenigen anderer durch Vitamin D bedingter Veränderungen festzustellen.

Die Tabelle 3 zeigt das Verhalten der Eiweisskörper nach Fütterung der Tiere mit *Cholesterin* in Oel gelöst. Bei der ersten Gruppe von Tieren, die total 2,5 Cholesterin erhielten, sind keine Veränderungen feststellbar. Bei den weiteren Gruppen tritt eine Eiweissverschiebung in dem Sinne auf, wie ich sie schon bei den Vitamin D-Tieren aufgeführt habe. Jedoch nimmt die Verschiebung nicht stufenweise von Gruppe zu Gruppe zu, sondern sie bleibt konstant, indem sich die beiden Fraktionen Myosin und Myogen + Globulin X annähernd das Gleichgewicht halten. Der Cholesteringehalt im Blut war sehr stark vermehrt, es kam dies deutlich zum Vorschein bei den Tieren, die innerhalb von 24 Stunden nach der letzten Cholesteringabe getötet wurden. Nachher sank der Cholesteringehalt im Blut rasch ab, blieb jedoch längere Zeit auf einer höheren Stufe als der Norm entspricht. (Siehe Tabelle 5.)

Das Körpergewicht zeigte eine stetige Zunahme und die Tiere wiesen keine Störungen irgendwelcher Art auf. Makroskopisch konnte ich sowohl an der Aorta wie am Herzen keine Veränderungen konstatieren.

Das Herzgewicht war sowohl bei den Vitamin D-Tieren wie bei den Cholesterintieren in den meisten Fällen innerhalb der normalen Grenzen. Eine Ausnahme bildete nur dasjenige Tier der Vitamin D-Serie, das 12,7 mg Vitamin D pro kg Körpergewicht erhalten hatte und starke Veränderungen an der Aorta aufwies. Bei diesem Tier war das Verhältnis des Herzgewichtes zum Körpergewicht = 3,33 ‰, während das normale Verhältnis 2,4 ‰ mit einer Abweichung von 10% plus oder minus beträgt. Dieses relative Ansteigen des Herzgewichtes bedeutet aber nicht eine Hypertrophie des Herzmuskels, sondern ist bedingt durch den raschen Gewichtsabfall, dem das Herz nicht folgen konnte.

Beantwortung der Fragestellung.

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben eine Veränderung der Eiweisskomponenten im Herzmuskel nach Anwendung von Vitamin D und Cholesterin.

Diese Veränderungen lassen sich in Beziehung bringen mit denjenigen der Aorta.

Zusammenfassung.

Untersuchungen über das Verhalten der Muskeleiweisskörper am Herzmuskel des Kaninchens nach Verabreichung von Vitamin D und Cholesterin haben ergeben:

1. Das Vitamin D in Dosen von 9 mg und mehr pro kg Körpergewicht hatte ein Ansteigen des Myosins unter gleichzeitiger Abnahme des Myogens + Globulin X zur Folge.

   Diese Dosen hatten bereits eine toxische Wirkung, welche sich in einem starken Gewichtsabfall, in Schläfrigkeit, starker Ermüdbarkeit und Atemnot äusserte.

   Ein Zeitunterschied zwischen dem Auftreten der Eiweissverschiebungen und demjenigen anderer Veränderungen war nicht feststellbar.

2. Das Cholesterin rief erst in Dosen von $10 \times 0{,}5$ g Eiweissveränderungen hervor, gleich denjenigen hervorgerufen durch Vitamin D.

   Diese Veränderungen gingen nicht stufenweise mit grösseren Dosen einher. Sie traten auf, bevor andere krankhafte Erscheinungen sichtbar wurden.

3. Die Resultate lassen sich mit denen der Aorteneiweisskörper in Beziehung bringen. Bei beiden Versuchsserien konnte eine Vermehrung der „Globuline" festgestellt werden:

   a) bei den Aorteneiweisskörpern durch vermehrtes Ausfallen mit Ammoniumsulfat,

   b) bei den Herzeiweisskörpern durch eine Zunahme des Myosins auf Kosten des Myogens + Globulin X.

Literatur.

v. Albertini: Praxis (Bern) 30, 14, 201.

Anitschow: Comptes rendus de la IIe Conf. int. de Path. géogr. 1934, 44
Cowdry: Arteriosclerosis 1933, 271.

Bergmann: I. Internat. Kongress der therap. Union Bern 1937, 30.

Bürger: I. Internat. Kongress der therap. Union Bern 1937, 77.

Edsall: Journal of Biol. Chem. 89, 1930, 289.

Frey: Zeitschrift für die ges. Neurol. & Psych. 167, 1939, 237.

Hartmann: Dissertation Lausanne 1941 im Druck.

Hinsberg: Med. Chemie für klin. u. theoret. Gebrauch 1938, 113.

Jung: Praxis (Bern) 27, 48 (1938).

Klotz: Comptes rendus de la IIe Conf. int. de Path. géogr. 1934, 120

Markoff: Beitrag zur path. Anat. 94, 377, (1935).

Meyer: Biochem. Zeitschrift 266, 1933, 137.

v. Muralt u. Edsall: Journal of Biol. Chem. 89, 1930, 315, 351.

Schönholzer: Deutsches Archiv für klin. Medizin 186, 1940, 27, 40 & 330;
187, 1940, 33.

Vannotti: Zeitschrift für exp. Medizin 99, 1936. 557.

Wassermann: Dissertation med. Bern 1936.

Wladimiroff: Biochem. Zeitschrift 167, 1926, 156.

Zurukzoglu u. Gordonoff: I. Internat. Kongress der therap. Union Bern, 1937, 178.